PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTRAL PROTEIN IMMOBILIZED CHIP FOR DETECTING HERBICIDE

Publication number: JP2001083155 (A)

2001-03-30

Also published as: B JP3689724 (B2)

Publication date: Inventor(s):

MIYAKE ATSUSHI: NAKAMURA CHIKASHI +

Applicant(s): AGENCY IND SCIENCE TECHN; MIYAKE ATSUSHI;

NAKAMURA CHIKASHI +

Classification:

- international: G01N21/27; G01N33/15; G01N33/53; G01N33/543; G01N21/25;

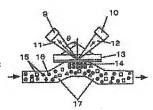
G01N33/15; G01N33/53; G01N33/543; (IPC1-7): G01N21/27; G01N33/15: G01N33/543

- European:

Application number: JP19990258029 19990910 Priority number(s): JP19990258029 19990910

Abstract of JP 2001083155 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure a triazine herbicide by using an immobilized photosynthetic reaction central protein with a histridine tag at a chip substrate. SOLUTION: In a measuring chip, a photosynthetic reaction central protein with a histridine tag is immobilized to a chip substrate. The measuring chip is mounted on a surface plasmon resonance measuring device (SPR) and can be used to measure a triazine herbicide. First, the chip is mounted on the SPR measuring device. That is, the chip 13 is installed so that a transparent substrate is disposed above. Then, a sample liquid containing an admixture substance 15 and a substance 16 to be measured is fed through a channel 17.; Then, a monochromatic light is irradiated from a light source 9 toward a transparent substrate of the chip 13 (incident light 11), and a reflected light 12 of a metal film provided at the chip 13 is incident to a detector 10. The detector 10 can detect an intensity of the reflected light 12.



Data supplied from the espacenet database - Worldwide

	,	

	法第30条第17 法人日本化学 年龄孩子基础	HINE	出職等特		33/53	33/15	21/27	0 1 N 33/543	Int.CL")日本国際部庁 (JP)
	(法典30条票1及後囲手票有り 平成11年3月15日 (法人日本化学会発行の「日本化学会終78春年中会 年度第十条要素「1▼」大容者	平成11年9月10日(1988.9.10)	本元 平11-258029				•	595	#5167 9			;	(JP) (12) 公開特許公報(A)
大 大 大 大 大 大 大 大 大 大 大 大 大 大	(74)上記1名の指定代謝人 22000415 工業技術院療養技術製合を (71)日難人 590128326 日本 著	工業技術完長 東京衛中代田	(71)出版人 000001144	新主教父 水	33/53	33/15	21/27	G01N 33/543	ΡI	(43)公開日			界公報(A)
実践深つくだが来!丁目1章4 工業技術 課 返業技術報会報素等50所内 600128837 中村「快 地対「大」の「大町米!丁目1章4 工業技術 認 医乳技術報会報表等50所分	の指統代別人 22000415 口樂技術院戲樂技術製合養養學院所具 以912858	其宗教中代田区震光道 1 丁田 3 華 1 号		D 解水湖の駅 5 OL (全 19 頁)	a	2	c	595 2G059	于-17-1·(参考)	平成13年3月30日(2001.3.30)	(P2001-83155A)	华麗2001-83155	(11) 等群田栗公果華中

19 10 10 10

8 8 ۾ ق

(54) 【発売の名类】 要其常表出のための光合成反応中心タソスク質国気化チャン

税根其汇据<

3 (修正有)

【課題】 際原有製田のための光合成反応中心タンスク

質固定化チップの提供。 チップ基板にヒスチジンタグ付き光合成

反応中心タンパク質が開泛化されていることを制数とす る表面プラズモン共写補近川チップ及びそれを川いてア トルジン等のトリアジン系数草葉を表記する方法。

【物語は水の範囲】

由プラズモン共鳴測定用チップ。 【請求項2】ヒスチジンタグが、光合成反応中心タンパ

応中心タンパク質を固定化してなる表面プラズモン共鳴 昭定用チップを用いる、トリアジン系線草剤の搬定方

求項4記載の測定方法。

の概定方法に関する。 **省方法及び返標送日チップを用いるトリアジン系数以利** 表面プラスモン共和国区用チップ、終測定用チップの製 チジンタグ付き光合成反応中心タンパク質を固定化した

安とするなどの知識さがあった。そこで、根膜物質を必 質、蛍光物質、発光物質、金属等で根源された物質を必 各等権国し西部政府部沿いきる反道、都派、教教有等 れている。しかしながら、これらの搬送技は、川野物質 反応を利用した測定法は、臨床検査等に広範囲に利用さ イムイムノアッセイキラジオイユノアッセイなどの免疫 ために様々な方法が開発されてきた。なかでも、エンサ 【従来の技術】これまで、検体中の微量物質を担定する 8

共鳴(SPR:surface plasman resonance)を利用した劉建 的物質を高感度に検出することのできる表面プラズモン 【0003】最近、標識物質を必要とすることなく、目 イなどに比べ、高感度な規定は困難であった。 では、エンザイムイムノアッセイやラジオイムノアッセ 佐暦反応側近法などが開発されているが、これらの方法 セイや原大ゲル内で抗算機を形成させて原元するゲル内 **やフール光線の吸出されり燃流するフールー人セノアッ 蓑としないアッセイ弦として、目的物質に結合した折け**

北井が料3の表面に、一郎物門と紹合する形成、近休な 属限2の上に、多孔性材料3が形成されており、この多 有している。すなわち、ガラス基板1上に成態された金 る。瀬定用チップは一般的に、図1に示すような構造を 識別素子)が固定化された制定用チップが装着されてい 一部分に、目的物質と特別的に結合するリガンド(分子 11.620-6271。この測定装置は、物質を抵加するセンサ

接触が開発された[Jonsson, D. (1991) BioTechnique:

【追求項1】 チップ 基板にヒスチジンタグ付き光合成反 応中心タンパク質を開定化してなることを特徴とする表

ラスモン共鳴側定用チップの製造方法。 応中心タンパク質をM近代することを特徴とする表面プ ク質の日サフユニットに結合してなるものである請求項 【請求項4】チップ基数にヒスチジンタグ付き完合成反 【請求項3】チップ基数にヒスチジンタグ付き完合成反 1 記載の表面プラズモン共鳴館定用チップ

【発明の詳細な説明】 【追求315】 トリアジン体標の処理アトルジンをある語

【発明の属する技能分野】本発明は、チップ基板にヒス 8

【0007】すなわち、本が別は、チップ県板にヒスチ 発明を完成するに至った。 [0006]

6 ジンタグ信き光合成反応中心タンパク質を固定化してな 発明を詳細に説明する。 パク質の日サブユニットに結合したものであり得る。

【0010】1. ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タ **制定に用いることができるチップをいる。 遺伝披露れちでも)百様地コル、ドシアカン所容長馬の** ているものであって、表面プラズモン共鳴測定装置(SPI チシンタグ付き光合成反応中心タンパク質が固定化され

どのリガンド4が担持又は固定されている。ここで、使 8 ンパク質の調整

8

用するリガンドを固定対象物質に合わせて置き換えるこ 時間2001-83155

共鳴創定用チップ[特関平11-211725]などが開発されて 8)、心理疾媒マーカーを確定するための表面プラズモン **めの表面プラズモン共鳴側定用チップ [特間平11-21172** 製造することが可能である。 とによって、特々の表面プラスモン共鳴通道川チップを 【0004】現在までに、ヘモグロビンAIを選定するた

いる。また、トリアジン系際草剤を搬定することができ は協能とされている [特間平10-267834]。 通常より共働シグナルが小さいため、直接要定すること が、アトラジンは、分子量が215.5ダルトンと小さく、 体を分子識別素子として固定化したものが報告されてい 然の一したちるアトルジン製研田とつて物アトルジン地 る表面プラズモン共鳴側提出チップについては、底像草

5

的とする。 いたドリアシン系際草剤の測定方法を提供することを目 **鳴側定用チップ、嵌チップの製造方法及び筒チップを用** 系統年利を直接滅託することができる表面プラズモン共 【短期が解決しようとする課題】本発用は、トリアジン

って、アトラジンを高層度に創定することに成功し、 反応中心タンパク質を固定化したものを用いることによ チップとして、チップ基製にヒスチジンタグ付き光合成 共物制定装置によるアトラジンの創定において、創定用 を解決するため鋭道研究を行った結果、表面プラズモン 【規則を解決するための手段】本が明れらは、上足謀な

用チップ(測定用チップともいう)は、チップ基板にヒス 院草剤(例えばアトラジン)の療法方法である。以下、本 弦である。さらに、本発明は、チップ基板にヒスチジン を特徴とする表面プラズモン共型銀辺川チップの製造方 【労利の実施の形態】本発明の表面プラズモン共鳴測定 面プラズモン共鳴側に用チップを用いる、トリアジンボ タグ付き光合成反応中心タンパク質を固定化してなる表 ンタグ付き光合規反応中心タンパク質を固定化すること 【0008】さらに、本発明は、チップ基板にヒスチジ ある。ここで、ヒスチジンタグは、光台展反応中心タン ることを特徴とする表面プルズモン共鳴運河田チップで

本発明において用いることができる光合成反応中心タン 【0011】(1)ロドバクター・スフェロイデス染色体D

って行うことができる。

【0014】PORによって特唱された新片が目的のIMAR

DSM (Beutsche Sammlung von Wittroorganismen und Zel デスは、ATCC (American Type Culture Collection) や において用いることができるロドバクター・スフェロイ することにより増捌させることができる。なお、本発明 は、ASY結婚やYCC結婚を用いて、50~100日間後年結論 obacter spheeroides)など)が挙げられる。この細菌 達(紅白光合成種寅ロドバクター・スフェロイテス(Mod あれば特に限定されず、例えばロドバクターに属する組 用し等る光台現式応中心ダンスク資を宗然し得るもので パク質の宗告報としては、トンアジン系領草剤と相互作

分解後、アルコール化表させることにより、現色体SMA る。 がいた、 リボヌクフアーが為明などによってBMを よる化学別処理伝によって機能を破壊し、核酸を抽出す **懸濁し、次いで、界面活性剤(例えばSIG、(TAB)などに** て得られた確保を、ロバッファーなどの適当な級策派は れる手法により行うことができる。例えば、指摘によっ り、その人手は容易である。 ligal turen Gabil などの微生物像小機因に個小されてお 【0012】指摘からの狭句会の私の調整は、通路応わ

を調覧することができる。

【0013】(2)ヒスチジンタグピタンパケ質発現ベケ

じ100を、LサブユニットDBAを作帖する場合、センス !!ggtgtgsctgcttt-3"(配列番号9)、アンチセンスプラ Aを増削する場合、センスプライマーについては5 -stgg ることができるプライマーとしては、Hサブユニット四 chain reaction)によって指標する。ここで、RSに用い マーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR:plymerase 型基配的に基づいて設計したオリゴヌクレオチドプライ ど)から取り寄せた前記サブユニットをコードするDMの 跡型として、塩基配列データベース(例えばGenBankな ードするMAを、上記(I)において得られた染色体DMを H、L、Mの3個のサブユニット(図2)のいずれかをコ クターを構築する場合、ます、該ケンパク質を構成する ドバウター・スフェロイデス由来の80タンパク貿別製人 うにして模型することができる。すなわち、例えば、ロ ヒスチジンタグREタンパク質現場ベクターは、以下のよ こついては5'-tcaggogtattcggccagca-3'(配列番

> い。合成は、MA合成数(例えばABI社製モデル391)によ おいてはこれらのプライマーに展光されるものではな (配別幣号14)を用いることができる。但し、本発明に スプライマーについては5'-tcagttcagtgggggcatgc-3 atggctgagtateagaacat-3 (配列番号13)、アンチセン agocattgatgoctoog-3'(配列番以12)、Mサブユニッ 列番号11)、アンチセンスプライマーについては5・4 トDMを指摘する場合、センスプライマーについてはS

一等) を用いて行うことができる。 表定義 (例えばPESKIN-ELMER社製373A DMシークエンお の方法により行うことができるが、道常は自動福基配列 **子等問信、シテオキシヌクレオチド武器制法などの公知** できる。塩基配列の決定は、マクサムーボルパートの化 ニング後、塩基配列を決定することによって行うことが (+) (STRATAGEIE社製)等の適当なくクターにサブクロー 片であることの確認は、得られた斯片をpBlueScriptSK

伝子の塩基配列を、配列番号8にMサブユニットのアミ 概配列を、配列番号7にMサプユニットをコードする道 子の塩基配列を、配列番号6にLサブユニットのアミノ 配列を、配列番号5に1.サプユニットをコードする遺伝 の私法的例を、船列番号2にHサブユニットのアミノ教 いて、配列番号1にHサブユニットをコードする遺伝子 スフェロイデス由来の光合成反応中心タンパク質につ ノ田的がを示した。

【0015】なお、本発明において用いたロドバクター

【0016】次いで、NCタンパク質をコードするNAAを

8 ターに組み込むことが必要である。そこで、ベクターに に辿っては、 本の適応子が指揮・翻訳されるように入り とが挙げられる。RGタンパク質をコードするDMの挿入 PSなど、酵母宿主用にはYEp13、YEp24、YCp50、Y1p30も 19、pUC118、pUC119など、枯草腐宿主用にはpUB110、pT 0)など、大帰婚宿主用にはp88322、p88325、p8018、p80 R. Scaerville (1952) J. Bacteriology 174, 2352-236 ロモーターを付加したpCBSOOMP [Renning, C. and C. D. Trollinger. (1988) Gene 70,191-197]や、これにフ pšīX415 Dieen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and る。例えば、ロドバクター・スフェロイデス協主用には 複製可能な様々なプラスミドMAを用いることができ ベクターとしては、使用する宿主に応じて、返宿主中で 適当な人のターに送信する。ここを出いることがたきる エンハンサー、ポリA付加ッグナル、選択マーカ プロモーター、ターミネーターなどの他、所望によ

プライマーについては5"-alggcactgctcagcttcga-3" (配 プチドをいう。改変は、コドンCACをいくつか導入した ヒスチジンが2~10個、好ましくは6~7個の場合した4 ドするIMAを改変する。ここで、ヒスチジンタグとは 合したものをコードするように前記肌タンパク質をコー 【0017】次に、配タンパク質にヒスチジンタグが収 SD配列などを選結することができる。

ドバクター・スフェロイデスを留主として用いた場合に 国際中に分裂させることができる。ここで、学生やのは ンを有した遺伝子を部分的に合成する。 を選択する。こうして人工的に組み換えヒスチジンコ) マーを用いて開始する。遺伝子改変に用いる前類はPG 挿入変異遺伝子を合成し、これを銅型としてFCRプライ イトを末端に有し、構造遺伝子C末端を含む遺伝子領は 機能に適した長さを持ち、組み換えに適した制限酵素も

配列を配列番号15に、アンチセンス銀例のDMI鎖を配 及びアンチセンス類倒の開味順を化学合成する。なお、 シャのこ 米森コード 調味を含むが100年後のセンス銀票 ングし得る相談的関係を37末間側に有する、Hサブユニ れるように収配した福温部別を有し且し互うにアニーリ C末橋に6個のヒスチジンが結合した6のをコードする 本定則において化学合成したセンス的別のIMAEIの私人 DMAは、以下のようにして調査することができる。 【0018】例えば、既タンパク質の日サフユニットの 、HサプユニットのC米場にヒスチジンタグが付加さ

見プラスミドは模築される。なお、水売別において頻繁 第近当位子が行られる。これを適当な実現へクターに存 **通桑ゴード部分と回旋することによって、ヒスチシンタ** 配列番号18に示した。次いで、得られたMA断片を ライマーを配列差号17に、アンチセンスプライマーを ることができる。ここで、用いることができるセンスフ グか付加されたC米福製製板をコードする製品的片をひ として民席を行うことによって、〇末端にヒスチジンタ 二本銀TRAを誘型、名乗の5 未満型の託列をプライマー を誘型として、3"側を延長合成する。さらに、得られた 列番号16に示した。次いで、センス顕頻及びアンチセ 入することでヒスチジンタグを付けたHサブユニット発 クが導入されたHサフユニットをコードする即場を告び ネイティブなHサブユニットをコードするIMAOC末端 ンス接側のIM旅をアコーリング後、互いの一本銀部分

Aの塩基配列を配列番号3に、アミノ酸配列を配列番号 【0019】(3)形質物製体の作製

したヒスチシンタグ付着Hサフュニットをコードする別

む発現ベクターのみを留主に導入するだけで、ヒスチジ 結されるように改変したサブユニットコード退伝子を含 には同種の光合成細菌を用いることが好ましい。 は、光合成反応中心を発現できるものであれば特に限定 することにより得ることができる。ここで、宿主として 用の形質転換体は、上記(1)において得られた発現ペク ンタグ付きサブユニットを含む85タンパク質を、接宿3 る遺伝子を元米、有しているため、ヒスチジンタグが連 で用いる場合には、該機生物はRCタンパク質をコードす [0020] ロドバクター・スフェロイデスを宿主とし されるものではないが、完全な影複合体を形成するため ターを、該タンパク質が発現し得るように貸主中に導入 本が例において川いるヒスチジンタグECタンパク質発見

質とヒスチジンタグが付加していない元々のタイプの裏 ヒスチジンタグ付きサブユニットを含む肌タンパク

近されるものをはない。例えば、セラッセムイオンを用 中に発現させることができる。例えば、Hサブユニット **いる方法、エフクトロボフーション技能が差別のれる。 独としては、細菌に300を導入する方法であれば特に限** スから構築することもできるし、Sockettらから人手す n, S. (1989) J. Bactertology 171, 436-446] に従っ tt. R. E., Donohue, T. J., Varga, A. K., and Kapla できる。 版欠制核は、Sockettらの手法【文献名:Socke 場合には、Hサブユニット欠損保担払1を用いることが にヒスチジンタグが結合した肌タンパク質を発現させる ジンタグ付き光合成反応中心タンスク質のみを記主組取 イデスを宿主として用いることによって、目的のヒスチ とするサブユニットを欠捌したロドバクター・スフェロ 紫雉になり得る。そこで、ヒスチジンタグを付加しよう されるため、目的のヒスチジンタグ付きサブユニットを タンパク質の2種類の民タンパク質が同一発主中に発現 【0021】(心とスチジンタグ配タンパク質の生産液 ることもできる。光合成循道への発現ベクターの導入元 て、ATOに実託されているロドバクター・スフェロイテ 何の門タンスク質の治院の手を氏がったり、整数三指数

いるものをいう。版タンパク質は、創記2において得る るいずれかのサブユニットにヒスチジンタグが結合して 【0022】形型流数体の共通において、その形型信息 類型することができる。 れた形質指数体の結構物から、以下のようにして狂器

ヒスチジンタグビタンパク質は、ビタンパク質を構成す

転換されたものである場合には、必要に応じてインデュ ーサーを招地に原加してもよい。例えば、lacプロモー 各が認識行のプロホーターを出いた関係人クターと形容 【0023】結義後、菌体内に生産されたタンパク質は アクリル酸(IAA)等を思想に添加してもよい。 ーと形容表表しな複形物を比点すると参言はインボース シド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクタ 横するときにはインプロピル-月-1-デオガラクトピラノ ターを用いた院送人クターと影響問題された贅田物を製

8 の原停は、超音波、フレンチプレス、ガラスピーズを依 **役物中から本分別に川いるクンパク質を単縁組製する**? 単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記院 トグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を ラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、成水クロマ 的方法、例えば指数アンモニウム故殿、ゲルクロマトク れ、タンパク質の単態解製に用するれる一般的な生化学 ルマトリックスを用いることで容易に分離できる。ま 後、ヒスチジンククを付与したECはN1-NTAを招待したケ 用するホモジナイサーなどを用いることがたまる。その 雑体を破砕することにより独出することができる。 菌体

報開2001-83155

【0024】2. 表面プラズモン共鳴側应用チップの製

イオン6を介して、ヒスチジンタグ7によって配位結合 本発売の創設用チップを製造するためには、表出にコト **南プラスモン共物組定用チップは、以下のようにして製** した光合成反応中心タンパク質8を有する。本発明の要 【0025】(1) ニトリロトリ酢酸を有するチップ活板 8

ウム、白金等が挙げられる。金属県2の展別は、100~2 が生じ得るようなもの、例えば、会、報、解、アルミニ 形成に用いる金属の種類としては、表面プラズモン共鳴 としては、0.1~20mの別点が発用して、果花、金銭間の ーサー光道道観らのが好まして、また、適別語数の写る の、輸送の対した既括右格宗治をおし西日右の確さだフ ボリエチワンテフフタワート、ボリカーボネートなど 用いることができる透明基板の素材としては、ガラス、 がたまる。また、我自己リアンロアン作者を合するチン ニトリロトリ酢酸を有するチップ基板としては、MTAセ えば、まず、透明脳板上に金属膜を形成する。ここで、 **ブ基板は必要に応じて自分で作製することもできる。例** ンサーチップ(ピアコア社)等の市販のものを用いること 界面で全反射するときに、その界面にエバネッセント製 【0028】光が観定用チップ13の通明陽極と外との

弦、蒸着法、イオンプレーティング弦、電気めっき法 好ましい。さらに、通用基板への付着性を考慮して、通 000人であるのが好ましく、特に200~600人であるのが 策略変わりを法律によって行うことができる。 次いで、 の形成は常弦によって行えばよく、例えば、スパッタ 介在層の厚さは、5~50Åであるのが好ましい。金属層 でもよい。クロムのからなる介在がを通ける場合、その 組織教と金属機との難にクロム等からなる介在層を続け

ロトリ酢糖催は、チオール基を有するニトリロトリ酢酸 ※、在や独の研究をしてリケンロケリ事業を延行さずる 分子を川いるセルフアッセンプル弦や、金属限表点に二 金属機数圏にニトリロトリ酢散磨を形成させる。ニトリ 【0026】(2) チップ基板上へのヒスチジンタグ配タ **方法方法等によって形成することが回牒である。** トリロトリ群級と反応し等る方学物質圏を形成させた 6

いで同様に、ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タンパ 接着フロー促滅機のコッケルイメン部署を形派時間戦 **小型のものである場合、まず、該装置に創定用チップを** 孫板を装着する 表面プラズモン共鳴側定装置がフローセ **固定化方法は常法によって行えばよく、弱えば、チッフ** チジンタグ航タンスク資を固定化する。 ボタンスク質の 表面にニトリロトリ的数を有するチップ基板上へ、ヒス リッケルイオンをコトリロトリ辞機に固定する。

ク資を選ぎことによった、コッケルイオンを介する形

ខ

長上にWildにし、本分別の銀辺リチップを引ることがで で、ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タンパク質を基

上記2において作数された表面プラズモン共鳴搬送用き ップを用いるトリアジン系際草剤の搬送 【0027】3、本発明の表面プラズモン共鳴測定用ラ

リロトリ酢酸を有するチップ基板が必要である。表面に ることができる。 れた金属際で反射したその反射光12が、奈虫器10に が残骸され(人転光)1)、 側辺用チップ 13に扱けら からは、親辺リチップ13の適明基板に向かって単位光 とを含む試料液を蒸路17を適して減す。次いで光源9 設置する。次いで、美雑物質15及び調定対象物質16 なわち、剥定チップ13は、透明基板が上になるように 寮定装置に装着する。装着後の様子を図5に示した。 概要を以下に示す。まず、本発明の撤促用チップをSPI 別を測定することができる。透装到を用いる測定手側の 製BLMCD院 XDを用いることによって、トリアジン系標準 ップを装着した中級のSPK側定装置(例えば、ピアコア社 入光する。検出器10では、反射光12の強度を検出す

の適度の変化を検知することができる。人材角のの変化 直プラズモン共鳴が生じる人動角のが変化する。従っ ンドとの利用作用により機能の出版事が委託すると、表 め、撤定対象物質と測定用チップ上に固定化されたリカ 度が低下する。ここで、表面プラズモンの被数は、金属 要表面のごく近くにある媒質の屈折率の影響を受けるた 表面プラズモンを問題するために使用され、反射光の強 モンといわれる表面数が生じる。この2つの表面数の数 程は共鳴シグナルといわれ、10~。の数名を1四として て、反射光張度曲線の谷のずれによって、創定対象物質 数が一致すると共働が起こり、光のエネルギーの一路が といわれる表前波が生じ、一方、全域原にも表面プラス

る。ただし、本発別はこれら実施例に限定されるもので 【技能例】以下、本が別を実施例により具体的に説明す (炭酸例1) ヒスチジンタグ配タンパク質の調製

[0029]

た。終始コドンの前に6規以のヒスチジンコドンCACを 含ませるように関ルをデザインした。まず、以下の配列 (1)ヒスチジンタグKタンパク貿易現ペクターの機関 111、Bas日で挟まれる1736pの領域のBM合成を行っ 1を用いてpubM構造遺伝子を含む遺伝子動片をpUC19へサ hue, T. J., Yanga, A. R., and Kaplan, S. (1989) J. 選伝子を含むプラスミドpMHSL404LSockett, R.E., Dono 一を以下のようにして構築した。まず、日サブユニット ヒスチジンタグ回タンパク質を発現させるためのベクタ ブクローニングした。これをpRFT16とした。次いで、8g Bacteriology171, 436-446)より、製製酵業Pst1、Sauli

を有する研究長期INMとPCNH短期INMを化学合成した。* * 【0030】

gcgcggcccgcgggggggccatgcggggatcagtggtggtggtggtggtgg-3 (配列番号1.6) 長期プライマー1:5 -agatetgoggeraegtegeoggegeetgatgtatgeogegeognagegea

[0031]

[0032] (反応条件) 作で行った。 auHIまでの2本網のMM円を完全化した。PCBは以下の条 **ら設計した。これらを退合し、FCRにより、Ngl llから8** 数プライマー2、知識プライマー2はアンチセンス網か 収録プライマー 1、知識プライマー 1 はセンス雌から収

72%, 155 72°C, 437 (**) 50°C, 25 95°C, 139 (*)

(1992) J. Bacteriology 174, 252-2560Jのプロモータ クターpCB8500程を[Benning, C. and C. R. Somerville 想され、 通りくHindlill、 Realiによって必要した必要へ 遊遊伝子はHod111、Basklにて切断することによって分 ト遺伝子が構造できた。この組み換え日サブユニット標 って、C末橋にヒスチジン6残基を有する日サプユニッ イティア選任子を除去したpB016に接続した。これによ 【0033】完全化した2本線WAM所存は8g1 II、8mm で未場を切断し、同じく8g1 II、8mmIIにて切断し、ネ

2466

% LDMO、40 ml/ ベダゾール)にて宿泊させることによ タンパク質をバッファー3(10 mg Trus (pfl 8.0) 、0.:

発現プラスミドは、Sockettらの方法[文献名:Sockett, よって組み換え日サブユニット構造遺伝子発現プラスミ 学部の拒徊的指導等より繰り及けたものだある。これに ー下橋へと接続した。ベクターpCESSOEPは大阪大学周 上記(1)において構築したヒスチジンタグ医タンパク質 【0034】(2) ヒスチジンタグMタンパクT性高格 FpCIIT919(図6)が完成した。

減にヒスチジンタゲを持つ配タンパク質を発現する様な を凝加したASY培地で増加可能なHサブユニットのC未 子導入した。次いで、カナマイシン、テトラサイクリン デスMBAIC、エフクトロボワーション伝によって通过 **築したHサブユニット欠損株ロドバクター・スフェロイ** R. E., Bonchue, T. J., Varga, A. R., antKaplan, (1989) J. Bactertology 171, 436-446)によって様

【0035】(3) ヒスチジンタグ肌タンパク質の生産及

短期プライマー2:5°-8gatcqggtgggggggggga-3′(和3H番号1-8) 知用プライマー1:5"-agatetgeggetacgtegee-3'(化別番号17)

(M.W-dimethyl-dodecylamineW-oxide))にて平衡化した ル、バッファー2(10 mi Tris (pil 8.0) 、0.1 % LDM0 に再整選した。菌体を関アーゼ、マグネシウム存在下で 100ml NoC1)に影響して再び集倒し、パッファー れなべなるまで、近岸した。吹いた、ヒスチシンタク目 ムに光楽し、パッファー2にて指出後の後光度があるの 4℃にて30分間、披昇処理した。処理後の懸覆液はカラ ファロースCL-68(Quiagen社製))を上がに加え、附所 1-NTAアジンCN1-NTAを運搬報に表面に招募させたあるも うに非常した。 (1000.5 % LIMO、 深道(105 M-/ ハタン) トホア間)の上海は現光度 (850 mm) か50以下になる』 より未満好困客を分類した。 別を合む光合成器(クロマ レフンテレフスされ来降し、10,000×g、30分の違うさ 10,000×gで集倒し、パッファー1 (10 s# Trts(pf 8. 模包、光函数条件下で72時間結構した。得られた修体を

国定化用チップとして、表面にニトリロトリ酢機(MTA) 実施例1において誘製した光合成反応中心タンパク質の 【0036】 [火路例 2] 分子流別系子のチップへのド

【0037】 [実施例3] 本党用の測定用チップを用い した。このようにして、他送川チップを作製した。 を挑選の。1/分で創設セルに振し込むことにより思い振 % (w/v)Tr1ton X-100を含む50mMリン酸級指張(pd 8.0) ジンタグ光合成反応中心タンパク質は、SOM MrCL 0.2 に固定化した。ここで、固定されていない余分なヒスチ ローティングし、図4のような結合によってチップ表面 光合成反応中心タンパク質溶液を液道10 p 1/分で3分層 ルイオンを配位させた。次いで、0.3µHtスチジンタグ グすることによりチップ表面のニトリロトリ酢種ニッケ 施術(pil 8.0)を推奨20 μ1/分で2分類を3回ローディン 50mWaCl. 0.2%(w/v)Tritom X-100を含む50mkリン酸級 た技術した。この整例被題の整件もルに、500 p.N MiCla 置81AO382 X(ピアコア社覧)のカートリッジプロック上 TAセンサーチップを、表由プラズモン共場(SPE)搬送装 つ加州センサーチップ(ピアコア社製)を用いた。ます、 ニトリロトリ酢酸(NTA)を結合したデキストラン催を招 を有する9m×9m、声さ50mの全層とその上に100mの

8

上記(3)において得られた株をASY培地を用い、30℃、

粉網2001-83155

r)	7) 特爾2001-83155
=======================================	12
系統は別の創定	*が見られた。これにより、本発明の測定用チップを用い
いて製造した搬送用チップを用いて、トリ	るこちによりアトラジン目を選ばすることできることが
※の1したあるアトルジンの意味した。光	わかった。

の高級認可のシッツを発生的した報告サイを報じ、10083) お報告やよう、ロス・ロ、ロ、以、対は10 別は10 優別の出り、実際のの報じ等サイを削いることによ 感覚により、シッツのを指述、は1分で10分割にしませら、トラソラン系数が研究機能で発記することができ 外別を受視し、共和シテナの日本がた。この指数を分割を 多者によった。第1で表すように、経験部を参加する。 サイトとのでは、正当が手で加えてお上がりの記載を

SUJURNE LISTING

(III) Noji Najimura, Director-General of Agency of Industrial Science and Technology: Jun Miyake: Chikashi Nakamura

(12)> Photosynthetic reaction center protein immobilized chip for herbicide detection

(213) Bhodehacter sphaeroides
(220)
(22) (35
(222) (1)...(780)

(210) 1 (211) 783 (212) 188 <130> 117R1094 <180> 16

And the state of t

The companies of the co

The Leaf Birst Off Fig. (1) The Leaf The Val. Proof Off Fig. (1) Sec. 50.5

TO THE SEC. TO THE SEC. THE SEC. THE SEC. THE SEC. 50.5

Says age congress congress contrage congress are governor to congress governor to congress governor to construct the Sec. 50.5

Sim Any Aug Proof the Alia Leaf Alia Ang The Alia Yai Sec. 61.6

Sim Any Aug Proof the Alia Leaf Alia Ang The Alia Yai Sec. 61.6

Sim Any Aug Proof the Alia Leaf Alia Ang Biret Alia Biret gate gate gate and gate congress congres

(6) MMI2 0 0 1 - 8 3 1 5 5 13 14 To Bits Ala Pro Bits Ala Pro Bits Ala Pro Bits May Pro Met Uys Asp Gly Val Gly Pro Ala 100 105 110

The state of the s

and of the profession of the state of the st

788 726

캺

gcc gaa tac goc tga Ala Glu Tyr Ala 260

©10> 2 ©21> 260 ©212> PET ©213> Rhodobacter sphaeroides

ccg get geg alet eag ggg crog tit c ocg tit, gog aleg coc aleg act titted fro Ala Ala Ala Cân Cây Fro Fre Fro Leu Pro Lys Pro Lys The Pine Fro Leu Pro Lys Pro Lys The Pine Fro Ala Ala Ala Cân Cây Fro Fre Fro Leu Pro Lys Pro Lys The Pine Fro Ala Ala Ala Ala Cân Cây Fro Fro Leu Pro Lys Pro Lys The Pro Leu Pro Lys Pro L	gag aac atg cgc gag ggc tat ccg ctg gag aac gag gac ggc Glu Asn Wet Arg Glu Gly Tyr Pro Lea Glu Asn Glu Asp Gly 35 45	ate tat age the tog ate the ete go gge etg ate tac tac ete cag lie Tyr Ser Phe Trp lie Phe Lou Ala Gly Leu lie Tyr Tyr Leu Gir 20 25 30	881 818 act 8ct til 88a sac til 9at cig 8cg icg cig Gly Val Tür Ala Phe Gly Asn Phe Asp Leu Ala Ser Leu 5 10	CZZD: CZZD: CZZD: CXZD:	(220) (220) A gene endoding the subunit B which was tagged with oligo-histid ize.	21D 3 21D 50 21D 500 21D MATIFICIAL Sequence	Leu Wet Tyr Ala Ala Pro Lys Arg Lys Ser Val Val Ala Ala Wet Lee 245 250 250	210 225 220 Thr Leu Leu Glu Glu Asp Lys 11e Cys Gly Tyr Val Ala	wet Gin wet Vai Gys Val Gin Ser Asn Ang Val His Val Asn Ala Lou 195 200 205 Ser Ser Asp Lou Phe Ala Gly Tie Pro Thr Lie Lws Ser Pro Thr Gin	Less Clu Val Clu Less Lys Asp Gly Ser Thr Arg Less 180 185 190	Ala Gly Lys Val Val Asp 11e Trp Val Asp 11e Pro Glu Gin Het Ala 165 170 175	Gly Lys Asa Pro Ile Gly Leu Pro Val Arg Gly Cys Asp Lem Glw Ile 145 150 150 155	Asn Lys lie Lys Pro Net Lys Ala Ala Ala Cly Phe His Val Ser Ala 130 140	Val Ala Arg Arg Asp Leu Pro Glu Leu Asp Gly His 115 120 125	Gly Asp Pro Net Lys Asp Gly Vai Gly I 105	
\$	i ii	8	6		p-histid											

特期2001-83155

CZCD. CZCD (ligh-has tidne tagged sebmit # CXCD (ligh-has tidne has been tidne	GID (GID See	245 250 255 gas tac goc cac cac cac cac cac cac cac ga Ciu Tyr Ala Bis Bis Bis Bis Bis Bis 280 266	The control of the co	Long was give longs to see to see you give can gag some year Clin Bell Wall Lype Nic Clin Core And Any Nail 1884 Nail Anno And 1895 1895 1895 1895 1895 1895 1895 1895	165 170 ct c c c c c c c c c c c c c c c c c c	anc ocg atc ggc Asn Pro 11e Gly 150 ang gtc gtg gac Lys Ya1 Ya1 Asp	And See Not to the See No. See	Asp Arg Pro 18 Alsa Len Alsa Arg The Alsa Val Sec Glio Gly Phe 50 58 61 75 75 75 75 75 75 75 75 75 75 75 75 75	17 coc one gạc cặc gặc cặc gặc cặc gặc cực gặc cực gạs aặc coc các các gặc cặc c	(10) 特別2001-83155
---	---	--	--	--	--	---	--	--	---	-------------------

The all and the first of the control	CID Transaction spheroids CID Transaction (CID Transaction CID	18 III.S III.S 265	The state of the s	100 March Cyter Wal Talk Age The Try Wal Age The Try Gair Gut her March	Gly Asp Pro Met. Lys Asp Gly Val Gly Pro 100 100 100 100 100 100 100 100 100 10	If the time start is the term is the object of the term is the object of
Alla Akan ille Pro Gly Gly De San Gy	The Len Gly 11e Hts Arg Len Gly Len Uny 200 205 tto tto age go cite tge atg ate att acc 200 205 The Phe Sor Alia Len Gys Wet 11e 11e Th 200 205 205 205 205 205 205 205 205 205	The section of the se	The state of the s	機能では、機能を使用していません。 では、対象を使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用していません。 では、するを使用したるを使用したるを使用していません。 では、を使用していません。 では、を使用していません。 では、を使用したるを使用しているを使用した。 を使用していません。 を使用したるを使用していません。 を使用したるを使用していません。 を使用したるを	The control was been as well as the control was the control wa	The state of the s

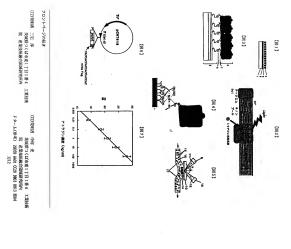
特開2001-83155 22

ž ŝ

Lie Gy Thic Lea Dy Lie Bas Agil Lea Gy Jean Lea Lea Ser Lea Ser Lea Ser Lea Ser Lea Ser Lea Ser Lea Lea Charle Lea Lea Lea Lea Lea Lea Lea Lea Lea Le	Lear Wal. Lear The Are S TO To Tail Met. Met. Pro Type Guy 11 ft Typ Tair Has Lear Any 150 ft Typ Tair Has Lear Any 150 ft Typ Tair Has Lear Any 150 ft Typ Tair New Type Met. The Type Met. The Third Scient Alla Lear Has Lair Lear Has Lear Any 150 ft Type Guy Lear And Lear And Lear Has Lear	Cryments experient Anthree me for the material and opt that is an interest to the control of the	(12) HRZ 2001 - 83 1 5 5 CID 202 CID
11 (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2)			The state of the s
576 576 572 572 572 573 574 575 576 576 577 577 577 577 577 577 577	C2 65 42 36 50	** 288 240 150 **	96 96 96

Values Copy and combine by the above the size of your few the shall got good manufacture by the size of the size o	The state of the s	All the parties of the first colour parts and make the start give city. All the parties of the first colour parts and parts and the first colour parts and	Age of a class cape of the Age of	(10) (10) (10) (10) (10) (10) (10) (10)
Catio 12 Catio 12 Catio 14 Cat	CID 11 CID 20 CI	CODD 10 COTED 10 COTE	aggs 9 aggs 9 aggs 10	The control of the co

<400>16 Realização: graposagga trigatogg arcgostorg gasago Realização: graposagga trigatogg arcgostorg gasago	C22D synthetic 3MA	@10 16 @11) 106 @12) DM @13) Artificial Sequence	<400) 15 apatripog ciagirga gogarciga igialgoga grapa iggrapaga gotggrapa rasgrasac accercaca cont	<pre><2120 BMA <2130 Artificial Sequence <2200 <2200 synthetic DMA</pre>	<pre><amo 14="" 15="" <z10="" <z11="" ggcgccatgc="" tcagttcage="">105</amo></pre>	<2200 <223> synthetic DMA	(210) 14 (211) 20 (212) NW.	<pre><4000 13 atggctgagt atcagaacat</pre>	(220) Synthetic DNA	©10) 13 ©21)> 20 ©212> DM	<400> 12 tragicating algoritors	31
(400) 16 SANSSANSSA TCTANTORY & STANTANTORY (SECTION 100) 16 SANSSANSA TCTANTORY & STANTANTORY & SANSSANSA TCTANTORY & SANSSA TC			(400) 15 apartinyag ciangtingar geograciga igialgonga geogragoga anglogging 60 laggagagai geoggangaa kangeroara accasera ecaet									(17)
106			tcg 60 105		8			29			29	特別2001-83155 32
のチップ基を入り	(M3) 中2007 ンパク質を固定! である。 「M4] トスキ!	略数である。 【図2】ネイティン パクター・スフェロ 水のカー・スフェロ を示した図である。 「図3】 * 208001	(2.3)	記列番リ11:合成100 記列番号12:合成100 記列番号13:合成100 記列番号14:合成100 記列番号115:合成100 記列番号16:令成100	10つ M / リー・トへ ソルタッドリテオれた H 厄列森 号 4 : オリゴヒ: エニット 配列森 号 9 : 合成3M 配列森 号 9 : 合成3M	[0039]						
AMP J EX. ファップ REPERMONETARY アプリアのボウンドのデップ基礎への場合メカニズルを示した例である。	に終り、作が打りにベイン・インドでル日本ののですがインパク質を関定的した表面プラズモン共鳴飛行用チップである。 である。 「関右1トスキジンタグ母を学のは行ぶ由さなンパク数	機関である。 「図2」ネイティブな光色様反応中心タンパク質のロド 「図2」ネイティブな光色様反応中心タンパク質のロド バクター・スフェロイデスの超級機長面上での存在状態 を示した図である。 「図3」本母組のドフォボンタがはネポやは同じのこと	(2011) - 1 合成DM (2014年) 1 :合成DM (2014年) 1 8:合成DM (2014年) 1 8:合成DM (2014年) 1 8:合成DM	JASEDINA JASEDINA JASEDINA JASEDINA	NEOPRO ファッキペトロ EXTRES 3、ペンコーペック ンでカタリ付きされた中サブエニットをユードする最近を 配列番号 4 : オリゴヒスチジンでタグ付けされたHサブ エニット 配列番号 3 : 合成別M 配列番号 3 : 合成別M	(400) 18 89a1cc8981 8889a888a	(220) Synthetic DNA	<210) 18 <212) 004 <212) 004	<400> 17 agatetgegg etacgtegee	C220) C223) Synthetic IMA	21D 17 21D 20 21D 8M	33
:	7 6 5 7	40 112 13	0876	8 5 4 3 2 1 3	での間間の							(18)
i nam	15・火穀物質 16・煮に対象物質	10・検出器 11・人製光 12・反製光 13・機応用チップ	6・・・ニッケルイオン 7・・・にスポジンタグ 8・・・光会成反応中心タンスク質 9・・・光源	【行いの原則】 1・・・ガラス高板 2・・・金銭服 2・・・多孔性材料 4・・・リガンド	「図6」にメデジンを創せてある。 「図6」にメデジング付き完合成反中心タンパケ 発想ペクターの構造を示した図である。 「図7」本報句の修正用チップを装着した紹牧課を) いてアドラジンを敷衍した場合の結果を示した図である。	本が明の銀辺川チッ						1/2
			スク資		「	20 【図 5 】 本が明の親近川チップを装引した政治プラズモ 			20			特間2001-83155 34



物間2001-83155

(9)